

F6



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 5/068, A61K 38/05, 47/48</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/14468</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. April 1998 (09.04.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05089</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 40 207.7 30. September 1996 (30.09.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Sürderstrasse 3, D-51375 Leverkusen (DE). VON DEM BRUCH, Karsten [DE/DE]; Bonifatiusstrasse 2, D-51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, D-42115 Wuppertal (DE). SPERZEL, Michael [DE/DE]; Normannenstrasse 31, D-42275 Wuppertal (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: GLYCOCONJUGATES OF MODIFIED CAMPTOTHECIN DERIVATIVES (A- OR B-RING LINKAGE)</p> <p>(54) Bezeichnung: GLYKONJUGATE VON MODIFIZIERTEN CAMPTOTHECIN-DERIVATEN(A- ODER B-RING-VERKNÜPFUNG)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns glycoconjugates of camptothecin derivatives in which at least one carbohydrate component is linked via suitable spacers to the A- or B-ring of a camptothecin derivative. The invention further concerns processes for preparing the compounds according to the invention, and their use as medicaments, in particular for use in conjunction with cancers.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Glykokonjugate von Camptothecin-Derivaten, in denen mindestens eine Kohlenhydrat-Komponente über geeignete Spacer und Abstandshalter mit dem A- oder B-Ring eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

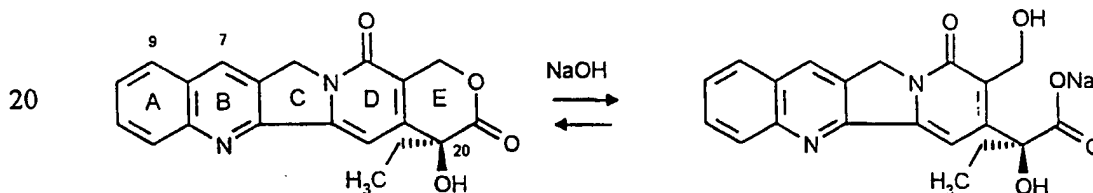
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Glykokonjugate von modifizierten Camptothecin-Derivaten (A- oder B-Ring-Verknüpfung)

5 Die vorliegende Erfindung betrifft Glykokonjugate von Camptothecin-Derivaten, in denen mindestens eine Kohlenhydrat-Komponente über geeignete Spacer und Abstandhalter mit dem A- oder B-Ring eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im
10 Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

20(S)-Camptothecin ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J.Am.Chem.Soc. 88, 3888 (1966)). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und
15 Löslichkeitsproblemen.

Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.



Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzyminhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in-vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

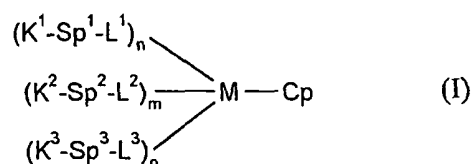
25 Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al. US 4943579). Letzteres Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al. WO 9602546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben

allerdings in-vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

Wir fanden nun überraschend, daß die Anknüpfung von Kohlenhydratderivaten über geeignete Spacer an Amino- oder Hydroxyl-Gruppen, die direkt oder über einen Abstandhalter mit dem A- oder B-Ring von Camptothecin-Derivaten verbunden sind, zu einer Verbindungsklasse mit hochinteressanten Eigenschaften führt:

- Die so erhaltenen Konjugate zeigen in-vitro eine hohe Aktivität gegenüber Tumorzelllinien und Tumorexografts.
- 10 - Sie weisen gegenüber den zugrundeliegenden Toxophoren eine deutlich höhere Verträglichkeit und Tumorselektivität sowie eine verbesserte Löslichkeit, insbesondere in wäßrigen Medien auf.
- In-vivo zeigen sie exzellente therapeutische Wirksamkeit über mehrere Dosisstufen.
- 15 - Sie sind in extrazellulärem Medium und in Blut wesentlich stabiler als die in der Literatur beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs von Camptothecin.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

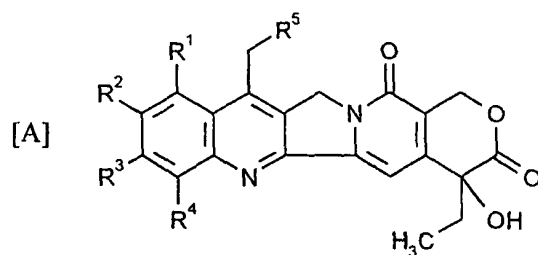


worin

20 n, m und o jeweils für die Zahl 0 oder 1 stehen und $n + m + o \geq 1$ gilt,

wobei

Cp für ein Camptothecin-Derivat der Formeln

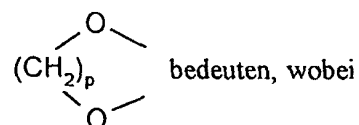


worin


R^1 , R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Alkyl mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen, Halogen, Amino, Hydroxy oder Nitro bedeuten können oder

5

R^2 und R^3 zusammen eine Gruppe der Formel

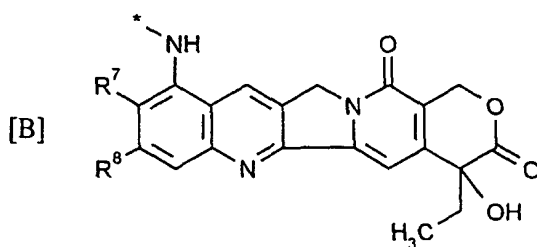


p die Werte 1 oder 2 annehmen kann, und

R^5 für $-O^*$, $-NH^*$ oder $-N$  $N-^*$ steht, oder für $-^*NR^6$

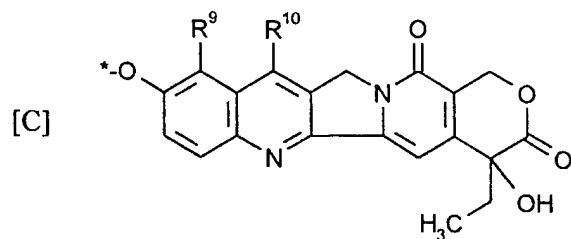
10

steht, worin R^6 Arylmethyl oder Hetarylmethyl bedeutet,



worin

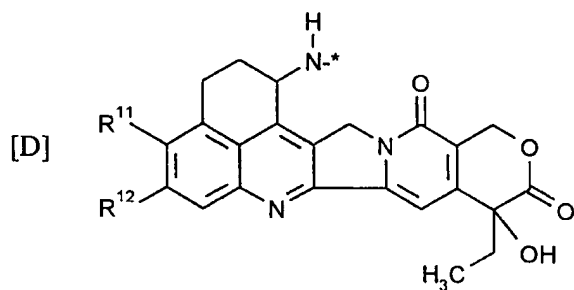
R^7 und R^8 wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,



worin

R⁹ für Wasserstoff oder -CH₂-N(CH₃)₂ steht und

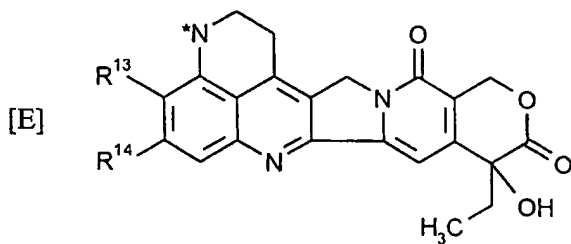
R¹⁰ für Wasserstoff oder Ethyl steht,



worin

R^{11} und R^{12} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

oder



worin

R^{13} und R^{14} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

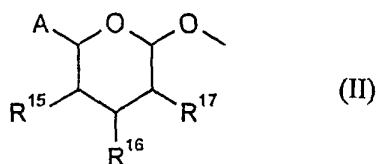
steht, wobei Cp über die mit * markierten Bindungen mit M verknüpft ist,

M für eine Brücken-Gruppierung steht, deren Hauptkette bis zu 21 Atome in linearer Abfolge umfaßt,

5 L¹, L², L³ unabhängig voneinander für Linker-Gruppierungen stehen, wie sie in der Glycokonjugat-Chemie gängigerweise eingesetzt werden (s. Übersichtsartikel Lee Y.C. and Lee, R. in Lectins and Cancer 1991, 53-69; edited by Gabius M.J. and Gabius S., Springer Verlag),

10 Sp¹, Sp² und Sp³ unabhängig voneinander für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen oder für Alkylen mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen stehen die jeweils gegebenenfalls substituiert sind, und

K¹, K² und K³ unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II)



stehen, worin

15 A Methyl, Hydroxymethyl, Alkoxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Acyloxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder einen Rest der Formel -CH₂-B bedeutet, worin

B für einen Rest der Formel (II) steht,

20 R¹⁵, R¹⁶ und R¹⁷ unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino, Halogen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 5/068, A61K 38/05, 47/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/14468 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. April 1998 (09.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05089 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. September 1997 (17.09.97) (30) Prioritätsdaten: 196 40 207.7 30. September 1996 (30.09.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LERCHEN, Hans-Georg [DE/DE]; Stürderstrasse 3, D-51375 Leverkusen (DE). VON DEM BRUCH, Karsten [DE/DE]; Bonifatiusstrasse 2, D-51375 Leverkusen (DE). BAUMGARTEN, Jörg [DE/DE]; Henselweg 13, D-42115 Wuppertal (DE). SPERZEL, Michael [DE/DE]; Normannenstrasse 31, D-42275 Wuppertal (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: GLYCOCONJUGATES OF MODIFIED CAMPTOTHECIN DERIVATIVES (A- OR B-RING LINKAGE)		
(54) Bezeichnung: GLYCOKONJUGATE VON MODIFIZIERTEN CAMPTOTHECIN-DERIVATEN(A- ODER B-RING-VERKNÜPFUNG)		
(57) Abstract The invention concerns glycoconjugates of camptothecin derivatives in which at least one carbohydrate component is linked via suitable spacers to the A- or B-ring of a camptothecin derivative. The invention further concerns processes for preparing the compounds according to the invention, and their use as medicaments, in particular for use in conjunction with cancers.		
(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Glycokonjugate von Camptothecin-Derivaten, in denen mindestens eine Kohlenhydrat-Komponente über geeignete Spacer und Abstandshalter mit dem A- oder B-Ring eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

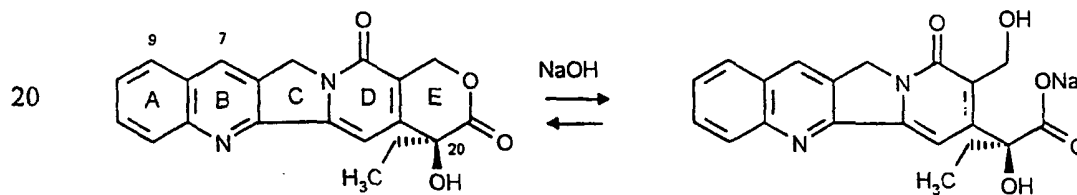
Glycokonjugate von modifizierten Camptothecin-Derivaten (A- oder B-Ring-Verknüpfung)

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Glycokonjugate von Camptothecin-Derivaten, in denen mindestens eine Kohlenhydrat-Komponente über geeignete Spacer und Abstandhalter mit dem A- oder B-Ring eines Camptothecin-Derivats verknüpft ist. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere im
- 10 Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

20(S)-Camptothecin ist ein pentacyclisches Alkaloid, das 1966 von Wall et al. isoliert wurde (J.Am.Chem.Soc. 88, 3888 (1966)). Es besitzt ein hohes Antitumor-Wirkpotential in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Tests. Leider scheiterte jedoch die Realisierung des vielversprechenden Potentials in der Klinik an Toxizitäts- und

15 Löslichkeitsproblemen.

Durch Öffnung des E-Ring-Lactons und Bildung des Natriumsalzes wurde eine wasserlösliche Verbindung erhalten, die in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der ringgeschlossenen Form steht. Klinische Studien führten auch hier bisher nicht zum Erfolg.



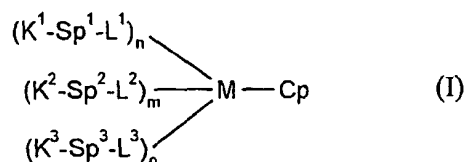
Etwa 20 Jahre später wurde gefunden, daß die biologische Aktivität auf eine Enzyminhibition der Topoisomerase I zurückzuführen ist. Seither wurden die Forschungsaktivitäten wieder verstärkt, um verträglichere und in-vivo wirksame Camptothecin-Derivate zu finden.

- 25 Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurden Salze von A-Ring- und B-Ring-modifizierten Camptothecin-Derivaten sowie von 20-O-Acyl-Derivaten mit ionisierbaren Gruppen beschrieben (Vishnuvajjala et al. US 4943579). Letzteres Prodrug-Konzept wurde später auch auf modifizierte Camptothecin-Derivate übertragen (Wani et al. WO 9602546). Die beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs haben

allerdings in-vivo eine sehr kurze Halbwertszeit und werden sehr schnell zum Grundkörper gespalten.

- Wir fanden nun überraschend, daß die Anknüpfung von Kohlenhydratderivaten über geeignete Spacer an Amino- oder Hydroxyl-Gruppen, die direkt oder über einen Abstandhalter mit dem A- oder B-Ring von Camptothecin-Derivaten verbunden sind, zu einer Verbindungsklasse mit hochinteressanten Eigenschaften führt:
- 5 - Die so erhaltenen Konjugate zeigen in-vitro eine hohe Aktivität gegenüber Tumorzelllinien und Tumoxenografts.
 - 10 - Sie weisen gegenüber den zugrundeliegenden Toxophoren eine deutlich höhere Verträglichkeit und Tumorselektivität sowie eine verbesserte Löslichkeit, insbesondere in wäßrigen Medien auf.
 - In-vivo zeigen sie exzellente therapeutische Wirksamkeit über mehrere Dosisstufen.
 - 15 - Sie sind in extrazellulärem Medium und in Blut wesentlich stabiler als die in der Literatur beschriebenen 20-O-Acyl-Prodrugs von Camptothecin.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

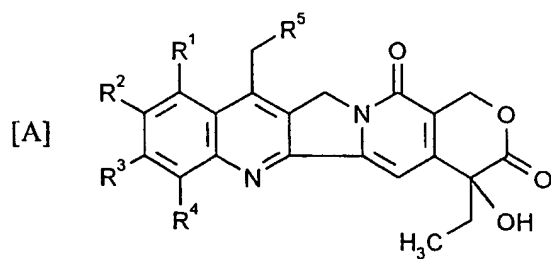


worin

- 20 n, m und o jeweils für die Zahl 0 oder 1 stehen und $n + m + o \geq 1$ gilt,

wobei

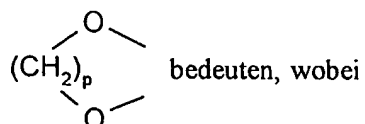
Cp für ein Camptothecin-Derivat der Formeln



worin

R^1 , R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Alkyl mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen, Halogen, Amino, Hydroxy oder Nitro bedeuten können oder

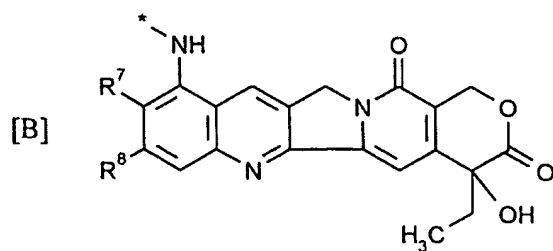
R^2 und R^3 zusammen eine Gruppe der Formel



p die Werte 1 oder 2 annehmen kann, und

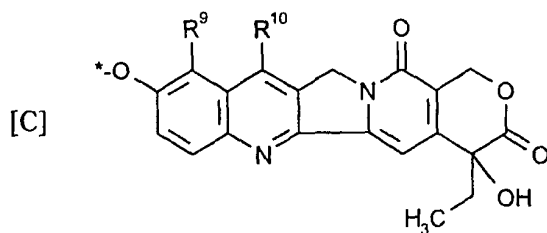
R^5 für $-O^*$, $-NH^*$ oder $-N$ (in a six-membered ring) $-^*$ steht, oder für $-^*NR^6$

steht, worin R^6 Arylmethyl oder Hetarylmethyl bedeutet,



worin

R^7 und R^8 wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

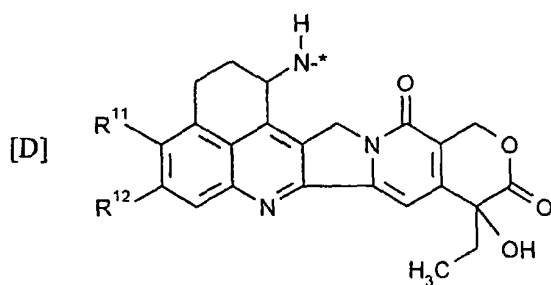


worin

R^9 für Wasserstoff oder $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ steht und

R^{10} für Wasserstoff oder Ethyl steht,

5

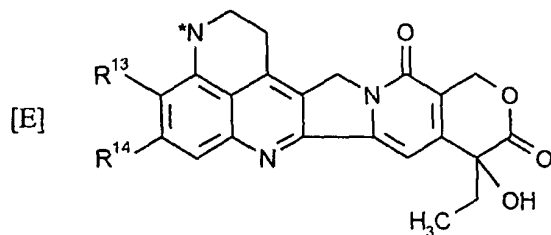


worin

R^{11} und R^{12} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

oder

10



worin

R^{13} und R^{14} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

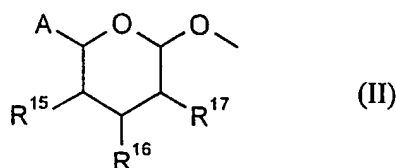
steht, wobei Cp über die mit * markierten Bindungen mit M verknüpft ist,

M für eine Brücken-Gruppierung steht, deren Hauptkette bis zu 21 Atome in linearer Abfolge umfaßt,

5 L¹, L², L³ unabhängig voneinander für Linker-Gruppierungen stehen, wie sie in der Glycokonjugat-Chemie gängigerweise eingesetzt werden (s. Übersichtsartikel Lee Y.C. and Lee, R. in Lectins and Cancer 1991, 53-69; edited by Gabius M.J. and Gabius S., Springer Verlag),

10 Sp¹, Sp² und Sp³ unabhängig voneinander für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen oder für Alkylen mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen stehen die jeweils gegebenenfalls substituiert sind, und

K¹, K² und K³ unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II)



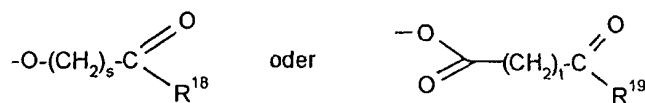
stehen, worin

15 A Methyl, Hydroxymethyl, Alkoxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Acyloxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder einen Rest der Formel -CH₂-B bedeutet, worin

B für einen Rest der Formel (II) steht,

20 R¹⁵, R¹⁶ und R¹⁷ unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, gegebenenfalls durch Hydroxy substituiertes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino, Halogen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln

- 6 -



bedeuten, worin

- 5 R^{18} und R^{19} unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen und

s und t unabhängig voneinander die Werte 0, 1, 2, 3 oder 4, insbesondere die Werte 1, 2, 3 oder 4 annehmen können

oder

- 10 R^{15} , R^{16} und R^{17} unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen

oder

zwei der Reste R^{15} , R^{16} , R^{17} zusammen für eine Epoxygruppe stehen,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

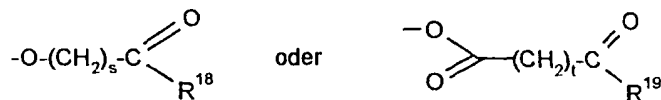
- 15 Der Begriff "Alkylgruppen" soll, sofern nicht anders angegeben, im Sinne der Erfindung geradkettige, verzweigte, cyclische und Cycloalkylreste enthaltende Alkylreste umfassen. Diese Definition soll sinngemäß auch für alle anderen Alkylgruppen enthaltenden Reste gelten, wie beispielsweise Alkoxy, Acyl usw..

- 20 Die bei der Definition von R^6 angegebenen Begriffe Arylmethyl und Hetaryl-methyl können beispielsweise Phenylmethyl bzw. Pyridylmethyl bedeuten.

Bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin K^1 , K^2 und K^3 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen können, wobei

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

R¹⁵ Wasserstoff, Hydroxyl, Methoxy oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

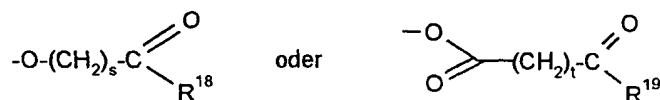
s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

5 R¹⁸ und R¹⁹ unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder

R¹⁵ für einen Rest der Formel (II) steht,

10 R¹⁶ Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln

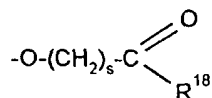


bedeutet, worin

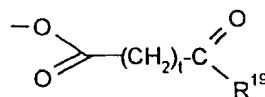
s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

15 R¹⁸ und R¹⁹ unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen,

20 R¹⁷ Hydroxyl, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, das gegebenenfalls durch Hydroxy substituiert ist, Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, oder eine Gruppe der Formeln



oder



bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

5 R^{18} und R^{19} unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder worin

R^{15} und R^{16} gemeinsam für eine Epoxygruppe stehen,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

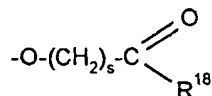
10 Ganz besonders bevorzugt stehen K^1 , K^2 und K^3 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II), wobei

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

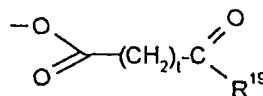
R^{15} und R^{17} jeweils eine Hydroxylgruppe bedeuten,

und

15 R^{16} Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



oder



bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R^{18} und R^{19} unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen.

5 Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die Kohlenhydrat-Bausteine K^1 , K^2 und/oder K^3 jeweils maximal zwei Monosaccharid-Bausteine.

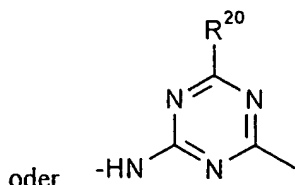
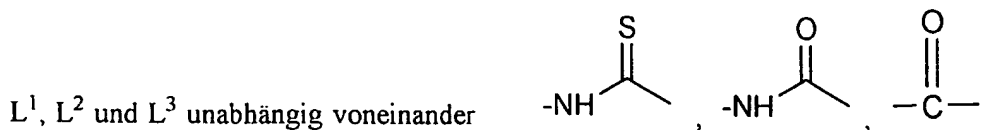
Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin Sp^1 , Sp^2 und/oder Sp^3 unabhängig voneinander für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen stehen können, das mit je einer Gruppe K^1 bzw. K^2 oder K^3 und L^1 bzw. L^2 oder L^3 verknüpft ist und das gegebenenfalls noch ein- oder mehrfach durch
 10 Hydroxy, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Nitro, Cyano, Halogen, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Halogenalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen oder durch Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

Besonders bevorzugt sind Sp^1 , Sp^2 und/oder Sp^3 , abgesehen von K^1 , K^2 oder K^3 und L^1 , L^2 oder L^3 , unsubstituiert oder gegebenenfalls substituiert durch Halogen, Nitro, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 2 Kohlenstoffatomen, $-OCF_3$ und/oder $-CF_3$.
 15

Ganz besonders bevorzugt sind Sp^1 , Sp^2 und/oder Sp^3 paraständig mit je einer Gruppe K^1 , K^2 oder K^3 und L^1 , L^2 , oder L^3 verknüpft und tragen keine weiteren
 20 Substituenten.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

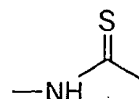
worin



bedeuten, wobei

R^{20} für Chlor oder für Hydroxyalkylamino mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht.

Besonders bevorzugt stehen L^1 , L^2 und L^3 für



5 Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin M für ein Peptid steht, das über eine Aminofunktion mit L^1 , L^2 und/oder L^3 verknüpft ist, über eine Acylfunktion mit Cp verknüpft ist und dessen Aminosäurebausteine gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können. Besonders bevorzugt sind Mono-, Di- und Tripeptide, insbesondere Mono- und Dipeptide.

10 Die Aminosäurebausteine werden bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Glutamyl, Threonyl, Asparagyl, Isoleucyl, Diaminopropionyl, Diaminobutyryl, Histidyl, Arginyl und/oder Ornithyl.

Besonders bevorzugt sind die Aminosäurebausteine Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Asparagyl, Histidyl und/oder Glutamyl.

15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in stereoisomeren Formen, beispielsweise als Enantiomere oder Diastereomere, oder als deren Gemische, beispielsweise als Racemat, vorliegen. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Stereoisomere als auch deren Gemische.

20 Stereoisomerengemische können, falls erforderlich, in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie oder durch Kristallisationsverfahren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können bedingt durch eine Rotationshinderung in rotationsisomeren Formen oder als deren Gemisch auftreten. Die Erfindung betrifft sowohl die reinen Rotationsisomere als auch deren Gemische.

25 Rotationsisomerengemische können gegebenenfalls, falls erforderlich, mittels bekannter Methoden in die einheitlichen Bestandteile getrennt werden, beispielsweise durch Chromatographie (z.B. HPLC) oder durch Kristallisationsverfahren.

Möglich ist dies nicht nur auf der Endstufe der Glycokongulate, sondern gegebenenfalls auch auf Zwischenstufen. Aus den rotamerenreinen Zwischenstufen können gegebenenfalls durch geeignete Syntheseführung die rotamerenreinen Endstufen hergestellt werden.

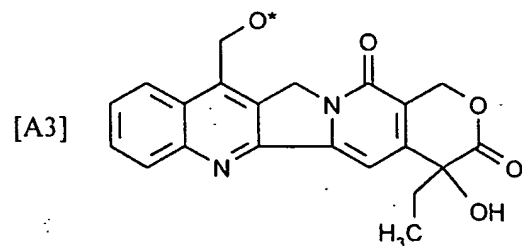
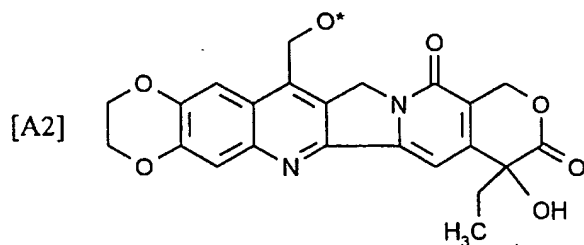
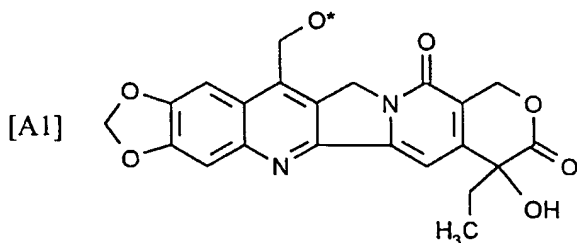
- 5 Die Stereochemie am anomeren Zentrum der Kohlenhydratbausteine K^1 , K^2 und/oder K^3 kann α oder β sein. Durch die Stereochemie an den anderen Zentren kann sich die gluco-, manno-, galacto-, gulo-, rhamno- oder fuco-Konfiguration ergeben.

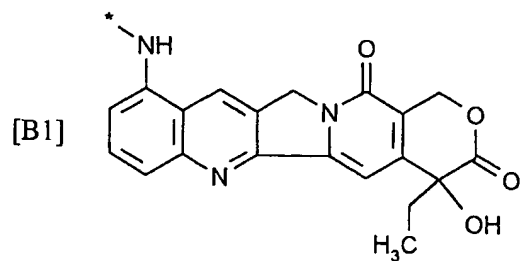
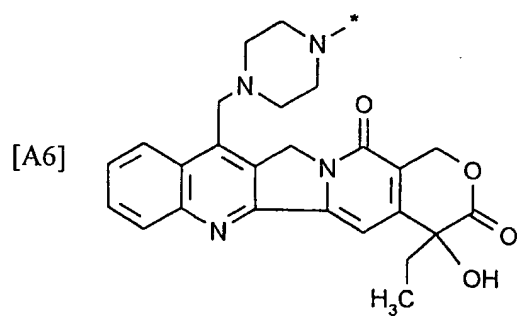
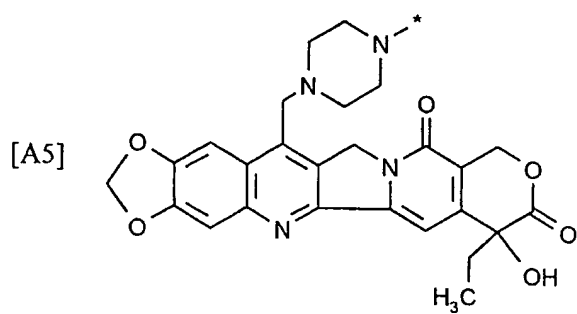
- 10 Die Aminosäurebausteine können ebenso wie die Kohlenhydratbausteine jeweils in der D- oder in der L-Form vorliegen.

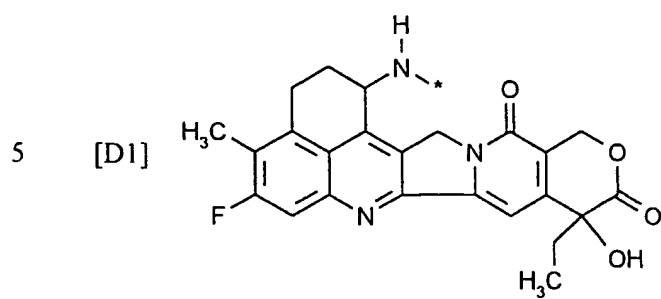
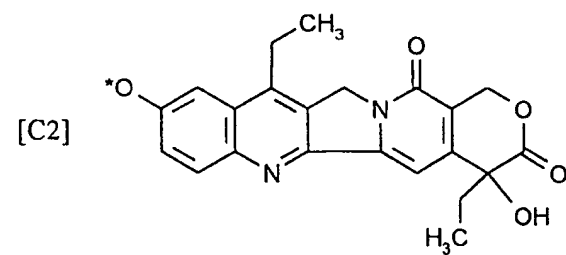
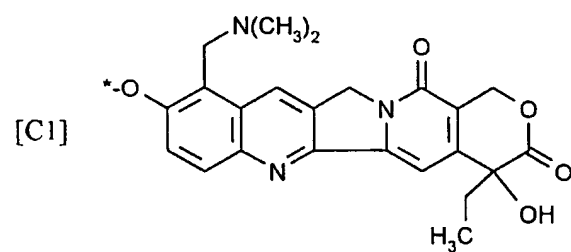
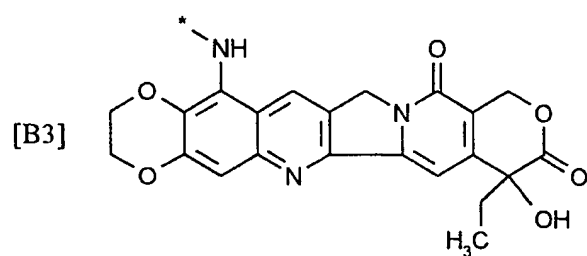
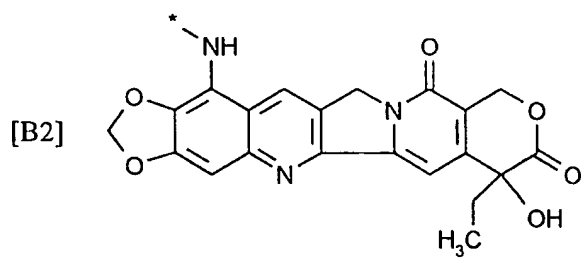
Der Camptothecin-Baustein Cp kann in der 20(R)- oder in der 20(S)-Konfiguration oder als Gemisch dieser beiden stereoisomeren Formen vorliegen. Bevorzugt ist die 20(S)-Konfiguration.

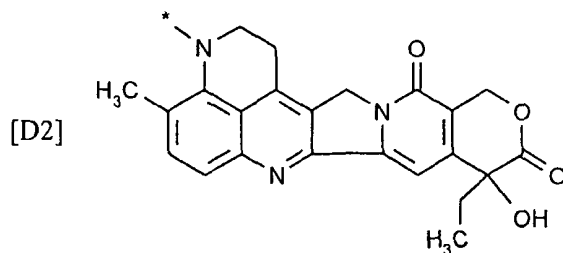
Bevorzugte Beispiele für den Camptothecin-Baustein sind:

15









Von diesen beispielhaft genannten Camptothecin-Bausteinen besonders bevorzugt sind: [A1], [A3], [A4], [B1], [B2], [D1].

- 5 Durch Kombination der für die einzelnen Reste angegebenen bevorzugten oder besonders bevorzugten Bedeutungen ergeben sich entsprechende ganz besonders bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel (I).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch in Form ihrer Salze vorliegen. Im allgemeinen seien hier Salze mit organischen oder anorganischen Basen oder Säuren sowie innere Salze genannt.

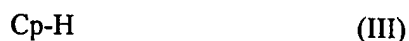
- 10 Zu den Säuren, die addiert werden können, gehören vorzugsweise Halogenwasserstoffsäuren, wie z.B. die Chlorwasserstoffsäure und die Bromwasserstoffsäure, insbesondere die Chlorwasserstoffsäure, ferner Phosphorsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure, mono- und bifunktionelle Carbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren, wie z.B. Essigsäure, Trifluoressigsäure, Maleinsäure, Malonsäure, Oxalsäure, Gluconsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Weinsäure, Zitronensäure, Salizylsäure, Sorbinsäure und Milchsäure sowie Sulfonsäuren, wie z.B. p-Toluolsulfonsäure, 1,5-Naphthalindisulfonsäure oder Camphersulfonsäure.

- 15 Physiologisch unbedenkliche Salze können ebenso Metall- oder Ammoniumsalze der erfindungsgemäßen Verbindungen sein, welche eine freie Carboxylgruppe besitzen. Besonders bevorzugt sind z.B. Natrium-, Kalium-, Magnesium- oder Calciumsalze, sowie Ammoniumsalze, die abgeleitet sind von Ammoniak oder organischen Aminen wie beispielsweise Ethylamin, Di- bzw. Triethylamin, Di- bzw. Triethanolamin, Dicyclohexylamin, Dimethylaminoethanol, Arginin, Lysin, Ethylendiamin oder Phenethylamin.

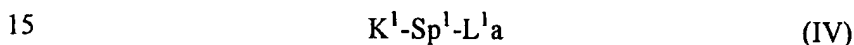
- 25 Die erfindungsgemäßen Glycokonjugate können beispielsweise hergestellt werden durch Verknüpfung von amino- oder hydroxymodifizierten Camptothecin-Deriva-

ten mit aktivierten Carboxylkomponenten, die ihrerseits beispielsweise Teile von geschützten Aminosäuren, Peptiden oder kohlenhydratmodifizierten Peptiden darstellen können.

5 Die Erfindung betrifft daher weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I), dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



10 worin Cp die oben angegebene Bedeutung hat und das Wasserstoffatom an den mit * bezeichneten Positionen sitzt, mit einer dem oben definierten Rest M entsprechenden aktivierten Carboxylkomponente Ma, die gegebenenfalls Schutzgruppen trägt, in einem geeigneten Lösungsmittel, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, nach üblichen Methoden umgesetzt, gegebenenfalls mittels bekannter Methoden selektiv eine, mehrere oder alle Schutzgruppen von M abspaltet und das Produkt mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV)



worin K^1 und Sp^1 wie oben definiert sind und L^1a für eine reaktive Vorstufe der Gruppe L^1 steht, umgesetzt, wobei gegebenenfalls die Schutzgruppen selektiv abgespalten und schrittweise verschiedene Gruppen $\text{K}^2\text{-Sp}^2\text{-L}^2$ - und $\text{K}^3\text{-Sp}^3\text{-L}^3$ - in vergleichbarer Weise eingeführt werden können

20 oder daß man, falls M ein Peptid bedeutet, in vergleichbarer Weise nach üblichen Methoden einen ersten Aminosäurerest in Form der entsprechenden gegebenenfalls Schutzgruppen tragenden aktivierten Carboxylkomponente einführt, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet, weiterhin gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Aminosäurereste anknüpft, gegebenenfalls erneut Schutzgruppen abspaltet, wie oben
25 angegeben Reste der Formeln $\text{K}^1\text{-Sp}^1\text{-L}^1$, $\text{K}^2\text{-Sp}^2\text{-L}^2$ und/oder $\text{K}^3\text{-Sp}^3\text{-L}^3$ - einführt und falls erforderlich Schutzgruppen abspaltet.

30 Die Reaktionen können bei verschiedenen Druck- und Temperaturverhältnissen, beispielsweise 0,5 bis 2 bar, bzw. -30 bis +100°C, in geeigneten Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF), Tetrahydrofuran (THF), Dichlormethan, Chloroform, niederen Alkoholen, Acetonitril, Dioxan, Wasser oder in Gemischen der

genannten Lösungsmittel durchgeführt werden. In der Regel sind Reaktionen in DMF oder THF/ Dichlormethan bei Normaldruck und bei einer Temperatur von 0 bis 60°C, insbesondere bei etwa Raumtemperatur, bevorzugt.

5 Für die Aktivierung der Carboxylgruppen kommen die in der Peptidchemie bekannten Kupplungsreagenzien wie sie z.B. in Jakubke/Jeschkeit: Aminosäuren, Peptide, Proteine; Verlag Chemie 1982 oder Tetrahedr. Lett. 34, 6705 (1993) beschrieben sind, in Frage. Bevorzugt sind beispielsweise Säurechloride, N-Carbonsäureanhydride oder gemischte Anhydride.

10 Weiterhin geeignet zur Aktivierung der Carboxylgruppen ist die Bildung von Addukten mit Carbodiimiden z.B. N,N'-Diethyl-, N,N'-Diisopropyl-, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-Hydrochlorid, N-Cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, oder Carbonylverbindungen wie Carbonyldiimidazol, oder 1,2-Oxazoliumverbindungen wie 2-Ethyl-5-phenyl-1,2-oxazolium-3-sulfat oder 2-tert-Butyl-5-methyl-isoxa-
15 zolium-perchlorat, oder Acylaminoverbindungen wie 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, oder Propanphosphonsäureanhydrid, oder Isobutylchloroform, oder Benzotriazolyl-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat, 1-Hydroxybenzotriazol oder N-Hydroxysuccinimid.

20 Als Basen können beispielsweise Triethylamin, Ethyl-diisopropylamin, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin oder andere eingesetzt werden.

Als Schutzgruppen für eventuelle Drittfunktionen der Aminosäuren oder Nicht-Verknüpfungspositionen im Camptothecin-Teil können die in der Peptidchemie bekannten Schutzgruppen beispielsweise vom Urethan-, Alkyl-, Acyl-, Ester- oder Amid-Typ eingesetzt werden.

25 Aminoschutzgruppen im Rahmen der Erfindung sind die üblichen in der Peptid-Chemie verwendeten Aminoschutzgruppen.

Hierzu gehören bevorzugt: Benzyloxycarbonyl, 3,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 2,4-Dimethoxybenzyloxycarbonyl, 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, 4-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitrobenzyloxycarbonyl, 2-Nitro-
30 4,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl (Boc), Allyloxycarbonyl, Vinyloxycarbonyl, 3,4,5-Trimethoxybenzyloxy-

- carbonyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlor-tert-butoxycarbonyl, Menthylloxycarbonyl, 4-Nitrophenoxy carbonyl, Fluorenyl-9-methoxycarbonyl (Fmoc), Formyl, Acetyl, Propionyl, Pivaloyl, 2-Chloracetyl, 2-Bromacetyl, 2,2,2-Trifluoracetyl, 2,2,2-Trichloracetyl, Benzoyl, Benzyl, 4-Chlorbenzoyl, 4-Brombenzoyl, 4-Nitrobenzoyl, Phthalimido, Isovaleroyl oder Benzyloxymethylen, 4-Nitrobenzyl, 2,4-Dinitrobenzyl, 4-Nitrophenyl oder 2-Nitrophenylsulfenyl. Besonders bevorzugt sind die Fmoc-Gruppe und die Boc-Gruppe.

Bevorzugte Carboxylschutzgruppen sind lineare oder verzweigte C₁-C₄-Alkylester.

- Die Modifizierung der mit einer Brücken-Gruppierung M verknüpften Camptothecin-Derivate mit Kohlenhydratresten kann über verschiedene Methoden und Linkergruppen erfolgen. Bevorzugt ist z.B. die Überführung von p-Aminophenylglycosiden in Isothiocyanate und die Verknüpfung beispielsweise mit Aminogruppen. Weiterhin können auch Carboxyalkyl- oder Aminoalkylglycoside leicht mit Amino- bzw. Carboxylgruppen gekuppelt werden.
- Die Abspaltung von Schutzgruppen in entsprechenden Reaktionsschritten kann zum Beispiel durch Säure- oder Base-Einwirkung, hydrogenolytisch oder auf andere Weise reduktiv erfolgen.

Biologische Testung

1. Wachstumsinhibitionstest zur Bestimmung der cytotoxischen Eigenschaften:

Die humanen Dickdarmzelllinien SW 480 und HT 29 (ATCC-Nr. CCL 228 und
5 HBT-38) sowie die Maus-Melanom-Zelllinie B 16 F 10 wurden in Rouxschalen in
RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10 % FCS gezogen. Anschließend wurde
trypsiniert und in RPMI plus 10 % FCS zu einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml
aufgenommen. 100 µl Zellsuspension/ Well wurden in eine 96 Mikrowellplatte
gegeben und 1 Tag bei 37°C im CO₂ Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden
10 weitere 100 µl RPMI Medium und 1 µl DMSO mit den Prüfsubstanzen zugesetzt.
Das Wachstum wurde nach Tag 3 und Tag 6 überprüft. Dazu wurde zu jedem
Mikrowell 40 µl MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolin-
bromid) mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml H₂O zugesetzt. Es wurde 5
Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium
15 abgesaugt und 100 µl i-Propanol/Well zugesetzt. Nach 30 min Schütteln mit
100 µl H₂O wurde die Extinktion bei 540 nm mit einem Titertek Multiskan
MCC/340 (Flow) gemessen.

Die cytotoxische Wirkung ist in der Tabelle 1 als IC₅₀-Wert (Dosis, welche das
Zellwachstum auf 50 % des Zellwachstums der Kontrolle inhibiert) jeweils für die
20 SW 480- und HT 29- und B16F10-Zelllinie angegeben:

Tabelle 1:

Beispiel	IC ₅₀ / μ M SW 480	IC ₅₀ / μ M HT 29	IC ₅₀ / μ M B16F10
1.1	0,015	0,025	0,18
1.3	0,04	0,03	n.d.
1.4	0,03	0,04	0,2
2.1	0,2	0,06	2
3.1	0,08	0,06	0,5
3.3	0,25	0,1	n.d.
3.5	0,3	0,3	n.d.
4.1	0,03	0,04	n.d.

2. Hämatopoetische Aktivität von Glykokonjugaten im Vergleich zum zugrundeliegenden Wirkstoff:

Material und Methoden

5 Knochenmarkzellen werden aus dem Femur der Maus gespült. 10^5 -Zellen werden in McCoy 5A-Medium (0,3 % Agar) zusammen mit rekombinantem murinem GM-CSF (Genzyme; Stammzellen-Kolonienbildung) und den Substanzen (10^{-4} bis 100 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C und 7 % CO_2 inkubiert. 7 Tage später werden die Kolonien (<50 Zellen) und Kluster (17-50 Zellen) ausgezählt.

Ergebnisse:

10 Wie in Tab. 2 am Beispiel 2.1 dargestellt, zeigen die untersuchten Glykokonjugate gegenüber dem zugrundeliegenden Wirkstoff eine etwa um den Faktor 100 verminderte Hemmung der Knochenmarkstammzellproliferation.

Tabelle 2:

	Beispiel	
	IC ₅₀	[$\mu\text{g/ml}$]
15	2.1.a	0,0016
	2.1	0,17

3. In-vivo-Hemmung des Tumorwachstums im Nacktmaus-Modell

Material:

20 Für alle in-vivo-Experimente zur Untersuchung der Hemmung des Tumorwachstums wurden athymische Nacktmäuse (NMRI nu/nu-Stamm) verwendet. Das ausgewählte großzellige Lungenkarzinom LXFL 529 wurde durch serielle Passage in Nacktmäusen entwickelt. Der menschliche Ursprung des Tumors wurde durch isoenzymatische und immunohistochemische Methoden belegt.

Experimenteller Aufbau:

25 Der Tumor wurde subcutan in beide Flanken von 6 bis 8 Wochen alten nu/nu-Nacktmäusen implantiert. Die Behandlung wurde, abhängig von der Verdopplungszeit, gestartet sobald die Tumoren einen Durchmesser von 5 - 7 mm erreicht

hatten. Die Mäuse wurden der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe (5 Mäuse pro Gruppe mit 8 - 10 auswertbaren Tumoren) durch Randomisieren zugeteilt. Die einzelnen Tumoren der Kontrollgruppe wuchsen alle progressiv.

5 Die Größe der Tumoren wurde in zwei Dimensionen mittels Schieblehre vermessen. Das Tumolvolumen, das gut mit der Zellzahl korreliert, wurde anschließend für alle Auswertungen verwendet. Das Volumen wurde gemäß der Formel "Länge x Breite x Breite / 2" berechnet ($[a \times b^2] / 2$, a bzw. b stehen für zwei rechtwinklig angeordnete Durchmesser).

10 Die Werte des relativen Tumolvolumens (RTV) wurden für jeden einzelnen Tumor durch Dividieren der Tumorgröße am Tag X mit der Tumorgröße des Tages 0 (zum Zeitpunkt der Randomisierung) berechnet. Die mittleren Werte des RTV wurden dann für die weitere Auswertung verwendet.

Die Hemmung der Zunahme des Tumolvolumens (Tumolvolumen der Testgruppe/Kontrollgruppe, T/C, in Prozent) war der abschließende Meßwert.

15 **Behandlung:**

Die Applikation der Verbindungen erfolgte an Tag 1, 2 und 3 nach Randomisierung intraperitoneal (i.p).

Ergebnisse:

20 Anhand der Verbindung aus Beispiel 1.1 ist die therapeutische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Glycokonjugate gegenüber dem großzelligen humanen Lungentumorenografts LXFL 529 dargestellt. Die Therapie führt bei der maximal tolerablen Dosis (MTD), bei 1/2 MTD und bei 1/4 MTD zu einer Komplettremission des Tumors.

Tabelle 3:

Therapie	Dosis [mg/kg/Tag]	Überlebens- zeit [Tage]	Zahl der Tumoren	relatives Tumorzvolumen an Tag 14 [% des Tages 0]	relatives Körpergewicht an Tag 7 [% des Tages 0]
Kontroll- gruppe	-	>21 >21 >21 >21 >21	10	691	102
1.1	12,5 (MTD)	>21 >21 >21 >21 >21	9	0,1	72
1.1	6,25	>21 >21 >21 >21 >21	10	0,1	93
1.1	3,125	>21 >21 >21 >21 >21	9	0,1	93

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen sowohl in-vitro als auch in-vivo eine überraschend starke Antitumor-Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumoren, insbesondere solchen der Lunge und des Dickdarms, verbunden mit einer großen Selektivität gegenüber nicht malignen Zellen auf.

Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von solchen der Lunge und des Dickdarms.

Zur vorliegenden Erfindung gehören pharmazeutische Zubereitungen, die neben nicht-toxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen enthalten oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls in einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

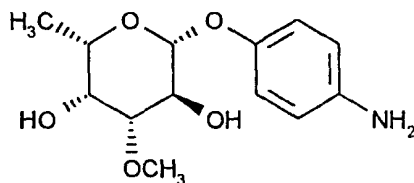
Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-%, der Gesamtmischung vorhanden sein.

- 5 Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer den erfindungsgemäßen Verbindungen auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

- 10 Im allgemeinen hat es sich sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen, den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in Gesamtmengen von etwa 0,5 bis etwa 500, vorzugsweise 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben, zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe vorzugsweise in Mengen von etwa 1 bis etwa 80, insbesondere 3 bis 30mg/kg Körpergewicht.

Beispiele:**Kohlenhydrat-Edukte****Beispiel 1.1:****p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid**

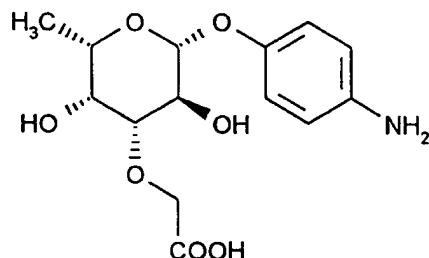
5

**1.1.a) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:**

6 g (21mmol) p-Nitrophenyl-β-L-fucopyranosid in 300ml absol. Methanol werden mit 7,84g (31,5mmol) Dibutylzinnoxid versetzt und 2h unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird eingeeengt, der Rückstand getrocknet und dann in 300ml DMF aufgenommen. Nach Zugabe von 15,7ml Methyljodid wird der Ansatz 40h bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 300ml Dichlormethan aufgenommen. Die Suspension wird filtriert, die verbleibende Lösung erneut eingeeengt und einer Flash-Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) unterzogen. Nach Einengen erhält man 3,82g (61%) des Zielproduktes.

1.1) p-Aminophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid:

3,81g (12,73mmol) p-Nitrophenyl-3-O-methyl-β-L-fucopyranosid werden in Methanol gelöst und nach Zusatz von Platindioxid in einer Wasserstoffatmosphäre bei geringem Überdruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Fällern mit Ether erhält man 3g (88%) des Zielprodukts. [DC: Dichlormethan/Methanol 9:1 R_f 0,53].

Beispiel 1.2:**p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosid****1.2.a) p-Nitrophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl-β-L-fucopyranosid:**

5 1g (3,5mmol) p-Nitrophenyl-β-L-fucopyranosid und 1,3g (5,2mmol) Dibutylzinnoxid werden in 50ml Methanol 2h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird eingengt, der Rückstand in 50ml Dioxan aufgenommen, mit 2ml Bromessigsäure-methylester sowie 100mg Tetrabutylammoniumiodid versetzt und
 10 16h unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das Produkt durch Flash-Chromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) gereinigt. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen und Fällen aus Methanol/Ether erhält man 455mg (37%) der Zielverbindung.

1.2) p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosid:

15 282mg (0,79mmol) p-Nitrophenyl-3-methoxycarbonylmethyl-β-L-fucopyranosid werden in 20ml Methanol gelöst und mit 440μl einer wäßrigen 2N Lithiumhydroxid-Lösung versetzt. Nach 2h Rühren bei Raumtemp. wird mit saurem Ionenaustauscher SC108 auf pH 3 eingestellt und filtriert. Zum Filtrat werden 250mg Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Anschließend wird 1,5h mit Wasserstoff bei geringem Überdruck hydriert, der Katalysator abgetrennt und mit
 20 Methanol gewaschen. Einengen, Aufnehmen in Wasser und Gefriertrocknung führen in 86%iger Ausbeute zum Zielprodukt (212mg). [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_F= 0,24]

Als weitere Kohlenhydratbausteine können beispielsweise die folgenden Derivate eingesetzt werden:

- 25 p-Aminophenyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-2-O-methyl-β-L-fucopyranosid
 p-Aminophenyl-2-O-hydroxyethyl-β-L-fucopyranosid

- p-Aminophenyl-4-O-methyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methyl- α -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-n-propyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-desoxy- β -L-fucopyranosid
5 p-Aminophenyl-3,4-didesoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-epoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-4-desoxy- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-hydroxyethyl- β -L-fucopyranosid
10 p-Aminophenyl-2-O-carboxymethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-succinyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-di-O-methyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- β -L-fucopyranosid
p-Aminophenyl- α -L-rhamnopyranosid
15 p-Aminophenyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-4-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-6-O-methyl- β -D-galactopyranosid
20 p-Aminophenyl-2,3-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,4-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid, Acetat
p-Aminophenyl-3,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
25 p-Aminophenyl-4,6-di-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,3,4-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,3,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-2,4,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4,6-tri-O-methyl- β -D-galactopyranosid
30 p-Aminophenyl-3-desoxy- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3,4-didesoxy- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-6-O-acetyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl- β -D-galactopyranosid, Natriumsalz
35 p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl-3-O-(N-methyl-carbamoylmethyl)- β -D-galactopyranosid
p-Aminophenyl- α -D-mannopyranosid

- p-Aminophenyl-3-O-methyl- α -D-mannopyranosid
 p-Aminophenyl-2,3-di-O-methyl- α -D-mannopyranosid
 p-Aminophenyl-3-O-methoxycarbonylmethyl- α -D-mannopyranosid
 p-Aminophenyl-3-O-carboxymethyl- α -D-mannopyranosid
 5 p-Aminophenyl-3-O-carbamoylmethyl- α -D-mannopyranosid
 p-Aminophenyl-4-O-(β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
 p-Aminophenyl-4-O-(3'-sulfat- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid,
 Natriumsalz
 p-Aminophenyl-4-O-(3'-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
 10 p-Aminophenyl-2-O-methyl-4-O-(3'-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid
 p-Aminophenyl-4-O-(3',4'-di-O-methyl- β -D-galactopyranosyl)- β -D-glucopyranosid

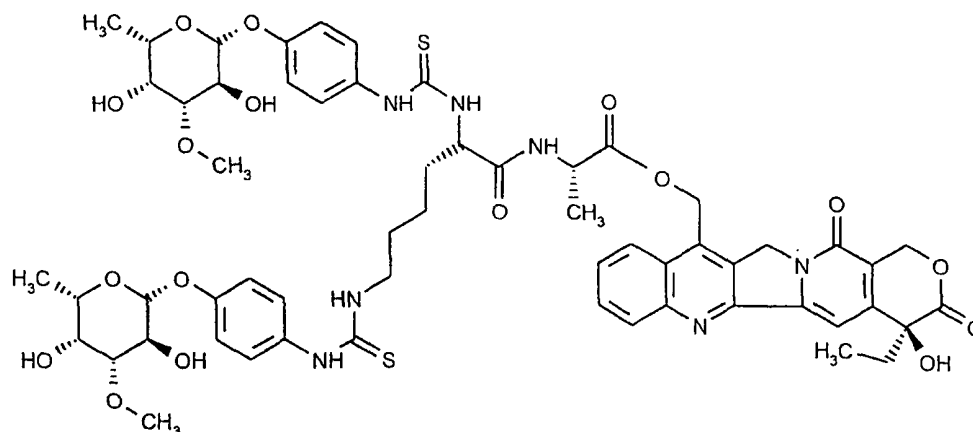
Bereits in EP 501 250 wurde die Synthese der folgenden Kohlenhydratbausteine beschrieben:

- 15 Carboxymethyl- β -L-fucopyranosid
 5-Carboxypentyl- β -L-fucopyranosid

Die Verknüpfung dieser beiden Bausteine mit Peptidkonjugaten kann in der in EP 501 250 beschriebenen Weise erfolgen.

Glycokonjugate

- 20 Beispiel 1.1:
 7-{N $^{\alpha}$,N $^{\epsilon}$ -bis-[O-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyloxymethyl}-camptothecin



1.1.a) 7-Hydroxymethyl-camptothecin:

Diese Verbindung wird nach der Vorschrift von Miyasaka et al. (Chem. Pharm. Bull. 39 (1991) 2574) hergestellt.

5 **1.1.b) 7-(L-Alanyloxymethyl)-camptothecin, Trifluoracetat:**

1g (2,64mmol) 7-Hydroxymethyl-camptothecin werden in 100ml DMF gelöst und dann mit 100mg 4-N,N-Dimethylaminopyridin und 1,5 Äquivalenten N-tert-Butoxycarbonyl-L-alanin-N-carboxy-anhydrid versetzt und die Suspension 16h bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein und reinigt durch Flash-Chromatographie an Ethylacetat/Petrolether 1:1 und später 1,5:1. Das gereinigte Material wird in 30ml Dichlormethan aufgenommen und bei 0°C mit 5ml Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30min Rühren wird eingeeengt und das aminodeblockierte Produkt aus Dichlormethan/Ether gefällt. Anschließend wird aus Dioxan/Wasser lyophilisiert. Man erhält die Zielverbindung in einer Gesamtausbeute von 59%. [FAB-MS: m/z = 450 = M+H].

1.1.c) 7-(L-Lysyl-L-alanyloxymethyl)-camptothecin, Bis-Trifluoroacetat:

200mg des Konjugats aus Beispiel 1.1.b werden zu einer Lösung aus 150mg (1,2Äq.) N^α,N^ε-bis-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin, 88mg N-Hydroxybenzotriazol und 100mg N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid in 20ml Dimethylformamid gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein, nimmt in Dichlormethan auf und extrahiert dreimal mit Wasser. Nach Trocknen der organischen Phase wird eingeeengt und aus Methanol/Ether gefällt. Anschließend wird das erhaltene Produkt in 15ml Dichlormethan

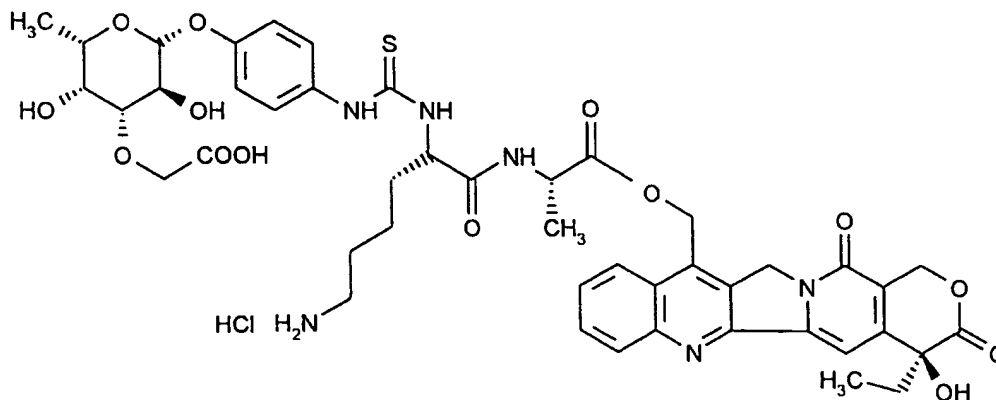
aufgenommen, bei 0°C mit 1ml Trifluoressigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Dann setzt man erneut 1ml Trifluoressigsäure zu und rührt eine weitere Stunde. Nach Einengen und Fällern aus Dichlormethan/Ether erhält man die Zielverbindung in 65%iger Ausbeute. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:5:3 $R_f = 0,44$]

1.1) 7-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyloxymethyl}-camptothecin

Eine Lösung von Verbindung I.1 (0,35mmol) in Dioxan/Wasser 1:1 (15ml) wird unter Rühren mit Thiophosgen (0,5mmol) versetzt. Nach 10 min. versetzt man mit 4 Äquivalenten Ethyldiisopropylamin, engt anschließend im Vakuum ein und trocknet den Rückstand für 1h im Ölpumpenvakuum. Das erhaltene Isothiocyanat wird in absolutem Dimethylformamid (10ml) gelöst und mit Verbindung 1.1.c (0,15mmol) sowie mit 4 Äquivalenten Ethyldiisopropylamin versetzt. Man rührt für 16h bei Raumtemperatur, engt dann im Vakuum ein und verrührt den Rückstand mit 20ml Wasser. Man saugt ab, nimmt den Rückstand in Dichlormethan/Methanol auf und fällen mit Ether. Nach erneuter Fällung erhält man das Zielprodukt in einer Ausbeute von 61%. [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,45$] [FAB-MS: $m/z = 1200 = M+H$].

Beispiel 1.2

7-{N^α-[O-(3-O-Carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyloxymethyl}-camptothecin, Hydrochlorid



1.2.a) 7-[N^ε-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-alanyloxymethyl]-camptothecin, Trifluoracetat:

Das Konjugat aus Beispiel 1.1.b wird nach Standard-Vorschrift mit N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysine verknüpft und anschließend an der α-Aminofunktion deblockiert.

1.2.b) 7-{N^α-[O-(3-O-Carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-N^ε-[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-alanyloxymethyl}-camptothecin:

Die Verbindung aus Beispiel 1.2.a wird in Analogie zu Beispiel 1.1 mit 1,2 Äquivalenten des Kohlenhydratderivats aus Beispiel 1.2 umgesetzt.

1.2) 7-{N^α-[O-(3-O-Carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyloxymethyl}-camptothecin, Hydrochlorid:

Das Konjugat 1.2.b wird mit Piperidin in DMF deblockiert. Nach 30min. engt man ein und digeriert den Rückstand zweimal mit Dichlormethan. Dann wird in DMF aufgenommen und mit Methanol/Ether gefällt. Das Produkt wird abgesaugt, mit Ether gewaschen und dann aus Dioxan/Wasser lyophilisiert. Anschließend nimmt man in Wasser auf, versetzt mit 1 Äquivalent einer 0,01N HCl-Lösung und lyophilisiert erneut.

Beispiel 1.3:

7-{N^α-[O-(3-O-Carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyloxymethyl}-camptothecin, Hydrochlorid

Die Verbindung wird analog zu Beispiel 1.2 hergestellt, nachdem 7-Hydroxymethyl-Camptothecin zuvor mit N-tert-Butoxycarbonyl-L-valin-N-carboxyanhydrid analog zu Beispiel 1.1.b acyliert wurde. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:3:1,5 R_f = 0,3] [FAB-MS: m/z = 961 = M+H].

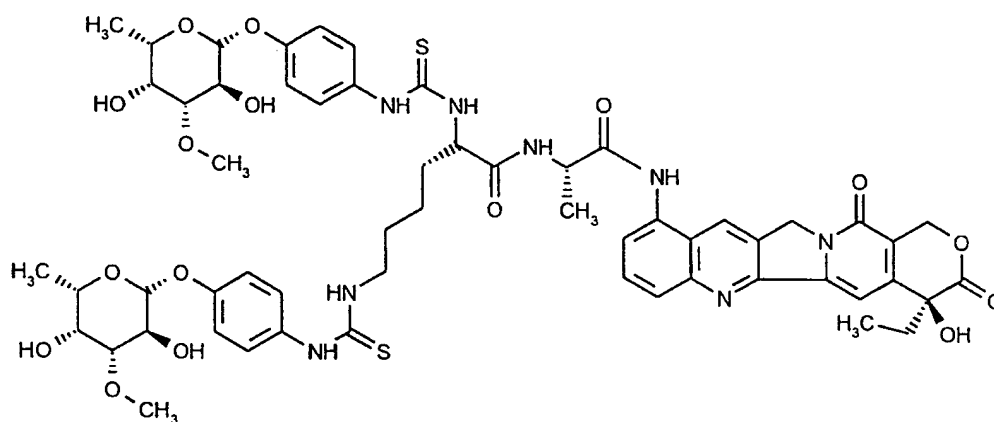
Beispiel 1.4:

7-{N^α-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyloxymethyl}-camptothecin, Hydrochlorid

Die Verbindung wird analog zu Beispiel 1.3 hergestellt. Als Kohlenhydratkomponente wird die Verbindung aus Beispiel 1.1 anstelle derer aus Beispiel 1.2 eingesetzt [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,34$].

Beispiel 2.1:

- 5 **9-{N^α,N^ε-bis-[O-(3-O-Methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl-amino}-camptothecin**



2.1.a) 9-Amino-camptothecin:

- Es wird nach der Vorschrift von Wani et al. (J.Med.Chem. 29 (1986), 2358) hergestellt.

2.1.b) 9-[L-alanyl-amino]-camptothecin

- N-(Fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-alanin (0,28 mmol) werden in bekannter Weise mit Thionylchlorid in das Säurechlorid überführt. Dieses wird nach kurzem Trocknen unter Schutzgas zu einer Lösung aus 0,14mmol der Verbindung 2.1.a und 17μl Pyridin in 20ml abs. Dichlormethan gegeben. Nach 16h Rühren bei Raumtemp. engt man ein, nimmt den Rückstand in DMF auf und setzt 500mg Celite zu. Man dampft das Lösungsmittel ab und gibt das an Celite gebundene Material auf eine mit Kieselgel gefüllte Flash-Säule. Anschließend chromatographiert man mit 5% Methanol in Dichlormethan. Die entsprechenden Fraktionen werden gesammelt, eingengt und mit Ether digeriert. Nach Trocknung erhält man die Fmoc-geschützte Zwischenstufe in 59 %iger Ausbeute. Das Produkt wird in 5ml DMF aufgenommen und zur Ablösung der Fmoc-Schutzgruppe mit 250μl Piperidin versetzt. Nach 20 min Rühren bei Raumtemp. engt man ein und fällt die

Zielverbindung aus Dichlormethan mit Ether. Sie wird quantitativer Ausbeute erhalten. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,2$].

2.1.c) 9-(L-Lysyl-L-alanyl-amino)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:

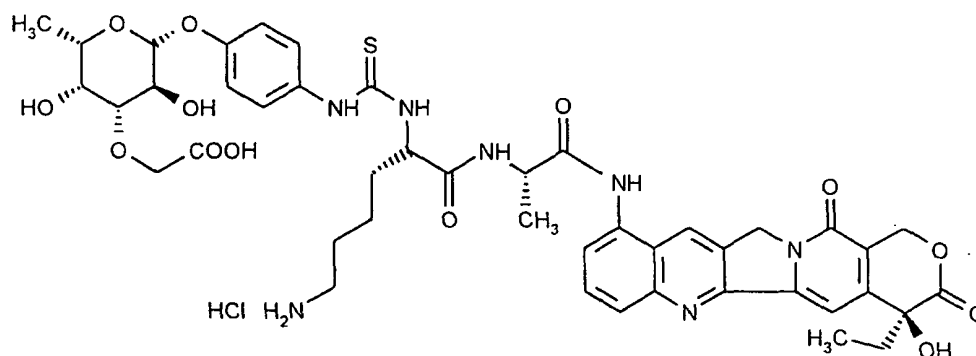
100mg des Konjugats aus Beispiel 2.1.b werden in Analogie zu Beispiel 1.1.c mit N^α, N^ϵ -bis-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin verknüpft und das Produkt anschließend mit Trifluoressigsäure deblockiert. Die Zielverbindung wird in 75%iger Gesamtausbeute erhalten. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:5:3 $R_f = 0,19$] [FAB-MS: $m/z = 563 = M+H$].

2.1) 9-{ N^α, N^ϵ -bis-[O-(3-O-Methyl- β -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl-amino}-camptothecin

In Analogie zu Beispiel 1.1 wird durch Kupplung des Peptidkonjugats 2.1.c mit dem Kohlenhydratderivat aus Beispiel 1.1 das gewünschte Glycokonjugat hergestellt. Ausb.: 60% [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,33$] [FAB-MS: $m/z = 1185 = M+H$]

Beispiel 2.2

9-{ N^α -[O-(3-O-Carboxymethyl- β -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl-amino}-camptothecin, Hydrochlorid



Dieses Konjugat wird in Analogie zu den Beispielen 1.2.a, 1.2.b und 1.2 aus dem L-Alanyl-Konjugat in Beispiel 2.1.b hergestellt.

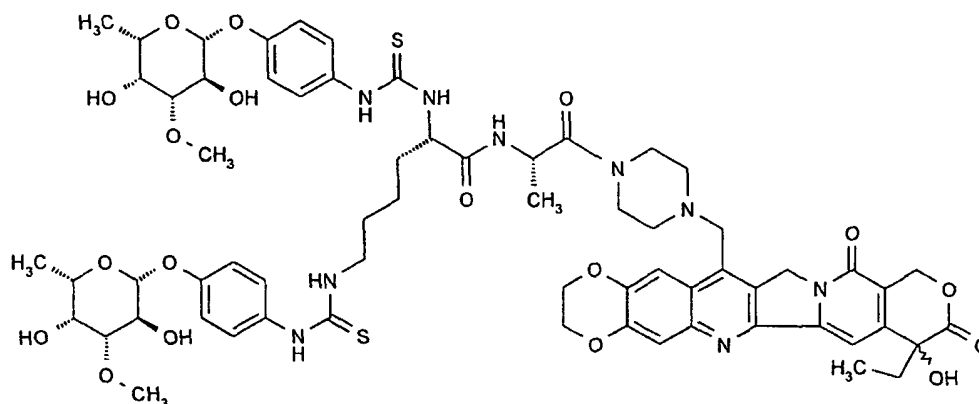
Beispiel 2.3:

9-{ N^α -[O-(3-O-Carboxymethyl- β -L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyl-amino}-camptothecin, Hydrochlorid

Die Verbindung wird analog zu Beispiel 2.2 hergestellt.

Beispiel 3.1:

10,11-(Ethyldioxy)-7-{1-[(N^α,N^ε-bis-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-L-lysyl-L-alanyl]-piperazino-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin



3.1.a) 7-(Chlormethyl)-10,11-(ethyldioxy)-20(R/S)-camptothecin:

Diese Verbindung wird in Analogie zu der 20(S)-Verbindung aus dem racemischen Tricyclus nach der Vorschrift von Luzzio et al. (J.Med.Chem. **38** (1995), 395) hergestellt.

3.1.b) N-(tert.-Butoxycarbonyl-L-alanyl)-piperazin

Man löst 1,15g des N-Hydroxysuccinimid-esters von N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-alanin in 100ml DMF und tropft die Lösung über 6h in eine Mischung aus 3,4g (10 Äquivalenten) Piperazin in 200ml DMF ein. Man engt ein, nimmt den Rückstand in Wasser auf und extrahiert dreimal mit je 200ml Dichlormethan. Die organische Phase wird getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält die Zielverbindung in einer Ausbeute von 88%. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 R_f = 0,42].

3.1.c) 10,11-(Ethyldioxy)-7-{1-[L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin, Trifluoracetat:

125mg (0,485mmol) der Verbindung 3.1.b werden in 2ml DMF aufgenommen und bei -50°C zu einer Lösung aus 100mg (0,22mmol) 3.1.a in 10ml DMF getropft. Man läßt auf Raumtemperatur erwärmen und 16h rühren. Anschließend reinigt man das entstandene Produkt durch Flash-Chromatographie an Kieselgel mit

Dichlormethan/Methanol 98:2 und später 96:4. Nach Einengen der entsprechenden Fraktionen erhält man die geschützte Zwischenstufe in einer Ausbeute von 44%. [DC: Dichlormethan/Methanol 95:5 $R_f = 0,3$]. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe nach Standardbedingungen mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan liefert die Zielverbindung in nahezu quantitativer Ausbeute. [DC: 5 Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,16$] [FAB-MS: $m/z = 576 = M+H$].

3.1.d) 10,11-(Ethylendioxy)-7-{1-[L-lysyl-L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin, Bis-Trifluoracetat:

50mg des Konjugats aus Beispiel 3.1.c werden zu einer Lösung aus 31mg (0,088mmol) N^α, N^ϵ -bis-(tert-Butoxycarbonyl)-L-lysin, 18mg N-Hydroxybenzotriazol und 20mg N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid in 5ml DMF gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man engt ein und verrührt den Rückstand mit Wasser. Anschließend wird das erhaltene Produkt in 5ml Dichlormethan aufgenommen, bei 0°C mit 500µml Trifluoressigsäure versetzt und eine Stunde bei Raumtemp. gerührt. Nach Einengen verrührt man den Rückstand mit Ether und fällt das Produkt aus Dichlormethan/Ether. Die Zielverbindung wird in 52%iger Gesamtausbeute erhalten. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:5:3 $R_f = 0,15$]

3.1) 10,11-(Ethylendioxy)-7-{1-[(N^α, N^ϵ -bis-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-yl-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-L-lysyl-L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin

In Analogie zu Beispiel 1.1 wird durch Kupplung des Peptidkonjugats 3.1.d mit dem Kohlenhydratderivat aus Beispiel 1.1 das gewünschte Glycokonjugat hergestellt. Ausb.: 77% [DC: Acetonitril/Wasser 10:1 $R_f = 0,31$] [FAB-MS: $m/z = 1326 = M+H$].

Beispiel 3.2:

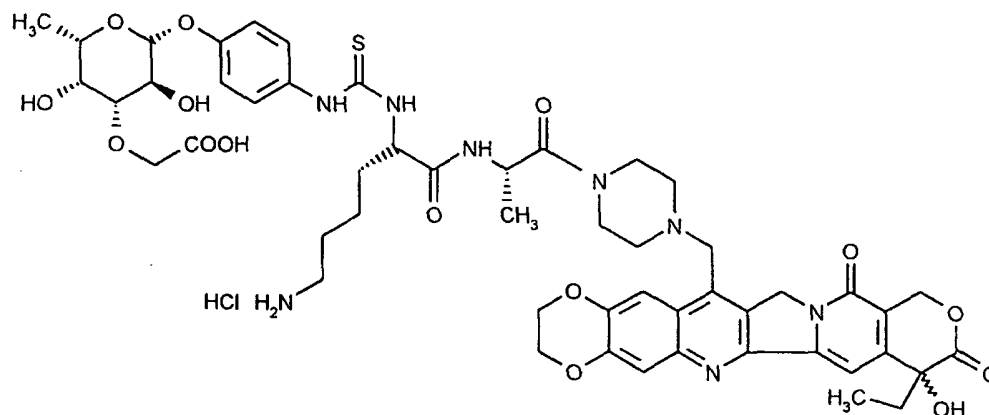
10,11-(Ethylendioxy)-7-{1-[(N^α, N^ϵ -bis-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-yl-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl)-L-lysyl-L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(S)-camptothecin

Dieses Produkt wird in völliger Analogie zu dem 20-(R/S)-Gemisch in Beispiel 3.1 aus dem enantiomerenreinen S-konfigurierten Tricyclus hergestellt.

Beispiel 3.3:

10,11-(Ethyldendioxy)-7-{1-[N^α-(O-(3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin, Hydrochlorid

5



Dieses Konjugat wird in Analogie zu den Beispielen 1.2.a, 1.2.b und 1.2 aus dem L-Alanyl-Konjugat in Beispiel 3.1.c hergestellt.

Beispiel 3.4:

10

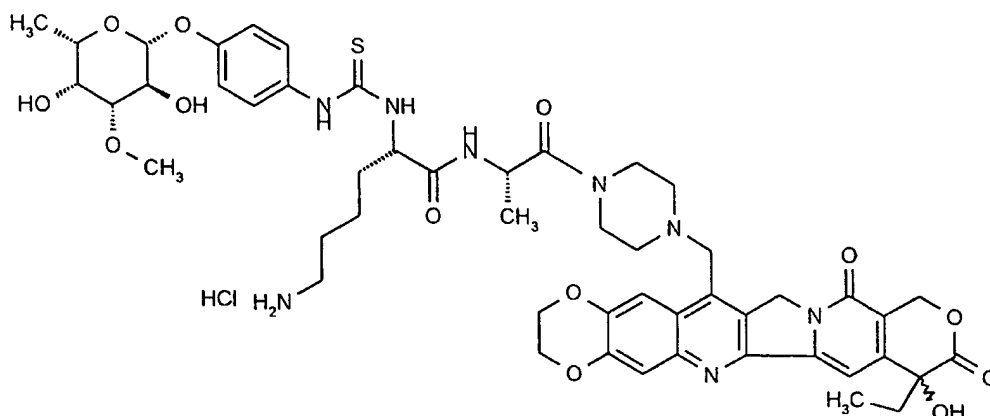
10,11-(Ethyldendioxy)-7-{1-[N^α-(O-(3-O-carboxymethyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-valyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin, Hydrochlorid

Die Verbindung wird analog zu Beispiel 3.3 hergestellt.

Beispiel 3.5:

15

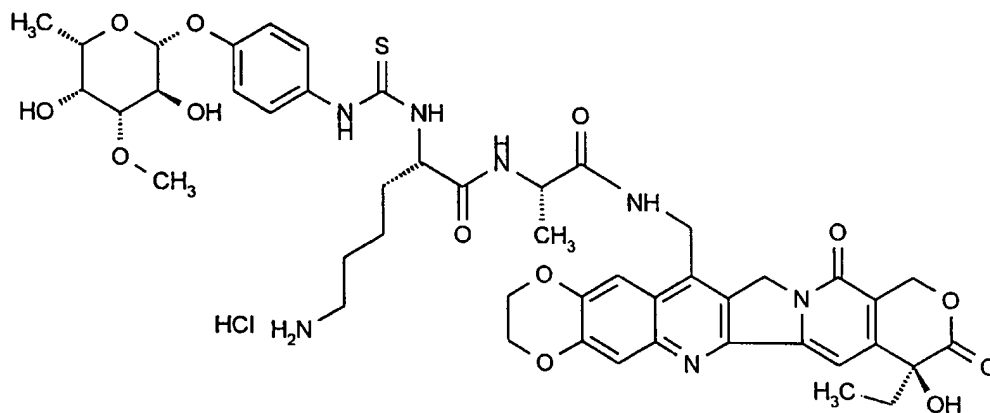
10,11-(Ethyldendioxy)-7-{1-[N^α-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl]-piperazin-4-yl-methyl}-20(R/S)-camptothecin, Hydrochlorid



Dieses Konjugat wird in Analogie zu Beispiel 3.3 mit dem Kohlenhydrat aus Beispiel I.1 hergestellt. [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:3:1,5 $R_f = 0,48$]

Beispiel 4.1:

- 5 **10,11-(Ethyldendioxy)-7-[[N^α-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxyphenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl]-aminomethyl]-20(S)-camptothecin, Hydrochlorid**



4.1.a) 10,11-(Ethyldendioxy)-7-aminomethyl-20(S)-camptothecin

- 10 Diese Verbindung wird nach den Vorschriften von Luzzio et al. (EP 540099) hergestellt. Ausb.: 32% [DC: Dichlormethan/Methanol 5:1 $R_f = 0,33$]

4.1.b) 10,11-(Ethyldendioxy)-7-[L-alanyl-aminomethyl]-(20S)-camptothecin

- 15 N-(tert.Butoxycarbonyl)-L-alanin-N-hydroxysuccinimidester (0,275mmol) werden in 10ml Dimethylformamid mit 0,275mmol der Verbindung aus Beispiel 4.1.a und mit 0,55mmol Ethyl-diisopropylamin versetzt. Nach 2h Rühren bei Raumtemp.

engt man ein und fällt den Rückstand aus Dichlormethan/Methanol (1:1) mit Ether. Nach wiederholter Fällung erhält man die Boc-geschützte Zwischenstufe in 70 %iger Ausbeute. Das Produkt wird in 10ml Dichlormethan aufgenommen und zur Ablösung der Boc-Schutzgruppe mit 2ml wasserfreier Trifluoressigsäure versetzt. Nach 30min Rühren bei Raumtemp. engt man ein und fällt die Zielverbindung aus Dichlormethan/Methanol mit Ether. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Einengen der wäßrigen Phase wird das Produkt erneut aus Dichlormethan/Methanol mit Ether gefällt. Ausb.: 69% [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 5:1:0,2 $R_f = 0,25$]
[FAB-MS: $m/z = 507 = M+H$].

4.1.c) 10,11-(Ethylendioxy)-7-[N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysyl-L-alanyl-aminomethyl]-camptothecin, Trifluoracetat:

Das Konjugat aus Beispiel 4.1.b wird nach Standard-Vorschrift mit N^α-(tert-Butoxycarbonyl)-N^ε-(fluorenyl-9-methoxycarbonyl)-L-lysin verknüpft und anschließend an der α-Aminofunktion deblockiert.

4.1.d) 10,11-(Ethylendioxy)-7-{{N^α-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-N^ε-[fluorenyl-9-methoxycarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl-aminomethyl}-20(S)-camptothecin

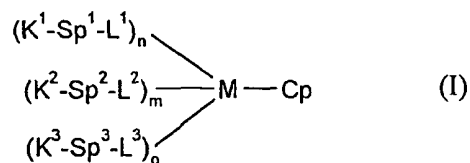
Die Verbindung aus Beispiel 4.1.c wird in Analogie zu Beispiel 1.1 mit 1,2 Äquivalenten des Kohlenhydratderivats aus Beispiel I.1 umgesetzt. Ausb.: 83%.

4.1) 10,11-(Ethylendioxy)-7-{{N^α-(O-(3-O-methyl-β-L-fucopyranosyl)-4-hydroxy-phenylamino-thiocarbonyl]-L-lysyl-L-alanyl-aminomethyl}-20(S)-camptothecin, Hydrochlorid

Das Konjugat 4.1.d wird mit Piperidin in DMF deblockiert. Nach 30min. engt man ein und fällt das Produkt zweimal aus Dichlormethan/Methanol mit Ether. Anschließend nimmt man in Wasser auf, versetzt mit 1 Äquivalent einer 0,01N HCl-Lösung und lyophilisiert. Ausb.: 69% [DC: Acetonitril/Wasser/Eisessig 10:3:1,5 $R_f = 0,39$][ESI-MS: $m/z = 946 = M+H$].

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel (I)

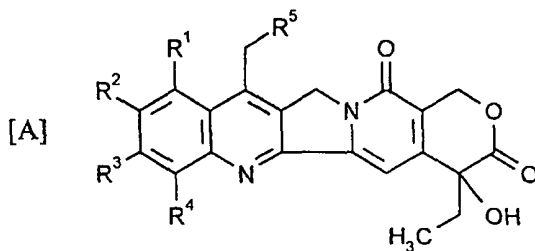


worin

5 n, m und o jeweils für die Zahl 0 oder 1 stehen und $n + m + o \geq 1$ gilt,

wobei

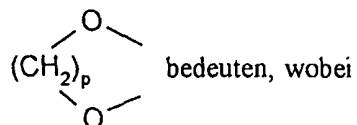
Cp für ein Camptothecin-Derivat der Formeln



worin

10 R^1 , R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Alkyl mit bis zu 3 Kohlenstoffatomen, Halogen, Amino, Hydroxy oder Nitro bedeuten können oder

R^2 und R^3 zusammen eine Gruppe der Formel

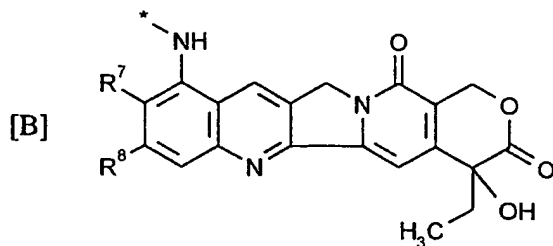


15

p die Werte 1 oder 2 annehmen kann, und

R^5 für $-O-^*$, $-NH^*$ oder $-N \text{---} \text{---} N-^*$ steht,

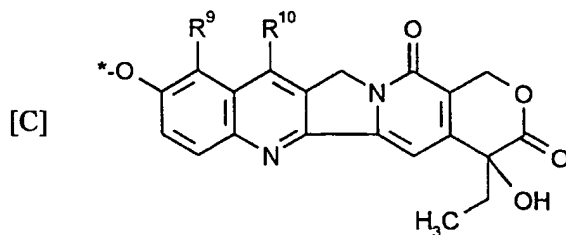
oder für $-^*NR^6$ steht, worin R^6 Arylmethyl oder Hetarylmethyl bedeutet,



5

worin

R^7 und R^8 wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

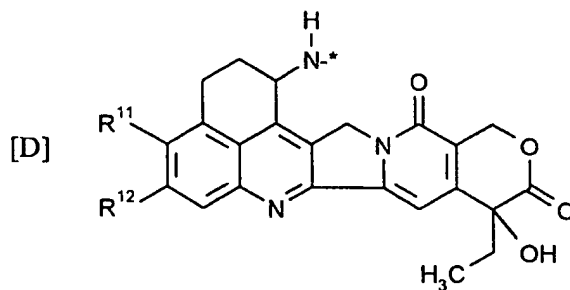


worin

10

R^9 für Wasserstoff oder $-CH_2-N(CH_3)_2$ steht und

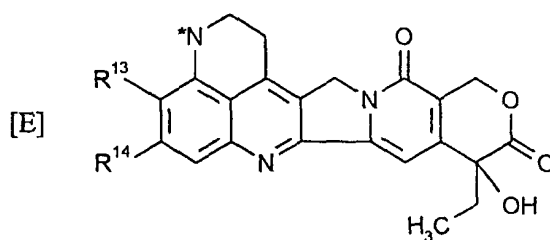
R^{10} für Wasserstoff oder Ethyl steht,



worin

R^{11} und R^{12} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleichen oder verschieden sein können,

oder



worin

R^{13} und R^{14} wie R^2 und R^3 definiert sind und mit diesen gleich oder verschieden sein können,

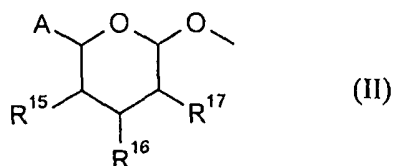
steht, wobei Cp über die mit * markierten Bindungen mit M verknüpft ist,

10 M für eine Brücken-Gruppierung steht, deren Hauptkette bis zu 21 Atome in linearer Abfolge umfaßt,

L^1 , L^2 , L^3 unabhängig voneinander für Linker-Gruppierungen stehen, wie sie in der Glycokonjugat-Chemie gängigerweise eingesetzt werden,

15 Sp^1 , Sp^2 und Sp^3 unabhängig voneinander für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen oder für Alkylen mit bis zu 8 Kohlenstoffatomen stehen die jeweils gegebenenfalls substituiert sind, und

K^1 , K^2 und K^3 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II)

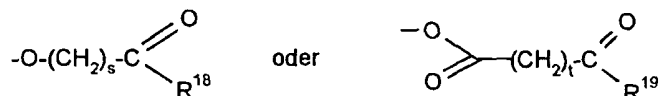


stehen, worin

A Methyl, Hydroxymethyl, Alkoxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, Acyloxymethyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen oder einen Rest der Formel $-\text{CH}_2\text{-B}$ bedeutet, worin

B für einen Rest der Formel (II) steht,

R^{15} , R^{16} und R^{17} unabhängig voneinander Wasserstoff, Hydroxy, gegebenenfalls durch Hydroxyl substituiertes Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino, Halogen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln



bedeuten, worin

R^{18} und R^{19} unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen und

s und t unabhängig voneinander die Werte 0, 1, 2, 3 oder 4 annehmen können

oder

R^{15} , R^{16} und R^{17} unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen

oder

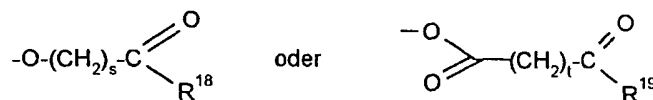
zwei der Reste R^{15} , R^{16} , R^{17} zusammen für eine Epoxygruppe stehen,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

- 5 2. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin K^1 , K^2 und K^3 unabhängig voneinander für einen Rest der Formel (II) stehen können, wobei

A Methyl, Hydroxymethyl, Methoxymethyl oder Acetoxymethyl bedeutet,

- 10 R^{15} Wasserstoff, Hydroxyl, Methoxy oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

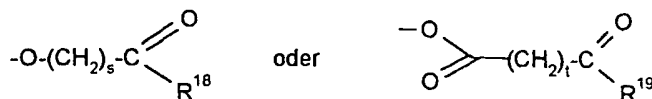
s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

- 15 R^{18} und R^{19} unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder

R^{15} für einen Rest der Formel (II) steht,

- 20 R^{16} Wasserstoff, Hydroxyl, Halogen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Sulfat oder eine Gruppe der Formeln

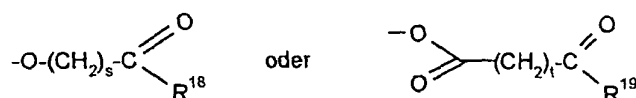


bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R¹⁸ und R¹⁹ unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen oder für Amino, das gegebenenfalls durch Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist, stehen,

R¹⁷ Hydroxyl, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, das gegebenenfalls durch Hydroxy substituiert ist, gegebenenfalls durch Alkyl oder Acyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiertes Amino oder eine Gruppe der Formeln



bedeutet, worin

s und t unabhängig voneinander die Werte 1 oder 2 annehmen können und

R¹⁸ und R¹⁹ unabhängig voneinander für Hydroxyl oder Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen stehen,

oder worin

R¹⁵ und R¹⁶ gemeinsam für eine Epoxygruppe stehen,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

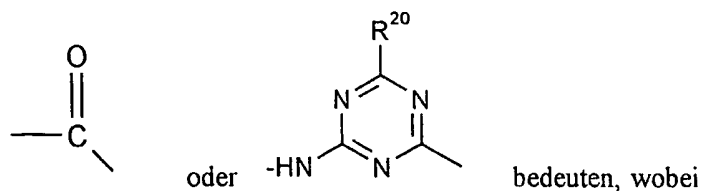
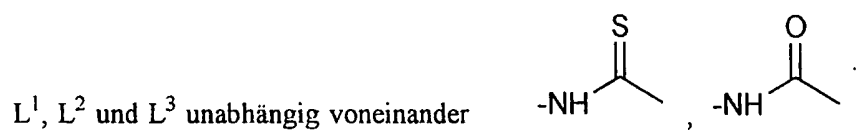
3. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin

Sp¹, Sp² und Sp³ unabhängig voneinander für Arylen mit bis zu 10 Kohlenstoffatomen stehen können, das mit je einer Gruppe K¹ bzw. K² oder K³ und L¹ bzw. L² oder L³ verknüpft ist und das

gegebenenfalls noch ein- oder mehrfach durch Hydroxy, Carboxy, Carboxyalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Nitro, Cyano, Halogen, Alkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Halogenalkyl mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen, Alkoxy mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen substituiert ist,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

4. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin



R^{20} für Chlor oder für Hydroxyalkylamino mit bis zu 6 Kohlenstoffatomen steht,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

5. Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, worin

M für ein Peptid steht, das über eine Aminofunktion mit L^1 , L^2 und/oder L^3 verknüpft ist, über eine Acylfunktion mit Cp verknüpft ist und dessen Aminosäurebausteine gegebenenfalls Schutzgruppen tragen können,

sowie deren Isomere, Isomerengemische und Salze.

6. Verbindungen gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß M für ein Mono-, Di- oder Tripeptid steht.

7. Verbindungen gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid aus gegebenenfalls Schutzgruppen tragenden Aminosäurebausteinen besteht, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Glycyl, Alanyl, Valyl, Leucyl, Lysyl, Seryl, Glutamyl, Threonyl, Asparagyl, Isoleucyl, Diaminopropionyl, Diaminobutyryl, Histidyl, Arginyl und/oder Ornithyl.
8. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel (III)



- worin Cp die oben angegebene Bedeutung hat und das Wasserstoffatom an den mit * bezeichneten Positionen sitzt, mit einer dem oben definierten Rest M entsprechenden aktivierten Carboxylkomponente Ma, die gegebenenfalls Schutzgruppen trägt, in einem geeigneten Lösungsmittel, gegebenenfalls in Gegenwart einer Base, nach üblichen Methoden umsetzt, gegebenenfalls mittels bekannter Methoden selektiv eine, mehrere oder alle Schutzgruppen von M abspaltet und das Produkt mit Verbindungen der allgemeinen Formel (IV)



- worin K^1 und Sp^1 wie oben definiert sind und L^1a für eine reaktive Vorstufe der Gruppe L^1 steht, umsetzt, wobei gegebenenfalls die Schutzgruppen selektiv abgespalten und schrittweise verschiedene Gruppen $\text{K}^2\text{-Sp}^2\text{-L}^2$ - und $\text{K}^3\text{-Sp}^3\text{-L}^3$ - in vergleichbarer Weise eingeführt werden können

- oder daß man, falls M ein Peptid bedeutet, in vergleichbarer Weise nach üblichen Methoden einen ersten Aminosäurerest in Form der entsprechenden gegebenenfalls Schutzgruppen tragenden aktivierten Carboxylkomponente einführt, gegebenenfalls Schutzgruppen abspaltet und weiterhin gegebenenfalls Schutzgruppen tragende Aminosäurereste anknüpft, wie oben angegeben Reste der Formeln $\text{K}^1\text{-Sp}^1\text{-L}^1$, $\text{K}^2\text{-Sp}^2\text{-L}^2$ und/oder $\text{K}^3\text{-Sp}^3\text{-L}^3$ einführt und falls erforderlich Schutzgruppen abspaltet,

daß man weiterhin gegebenenfalls nach üblichen Methoden die Stereoisomeren trennt und daß man gegebenenfalls die Verbindungen in ihre Salze überführt.

- 5 9. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln.
10. Arzneimittel enthaltend Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß Anspruch 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 97/05089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K5/068 A61K38/05 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 42 36 237 A (BEHRINGWERKE AG) 28 April 1994 see page 2 - page 3 see page 3, line 17 - line 44 ---	1-10
X	EP 0 624 377 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 17 November 1994 see page 1 - page 3 see page 9, line 50 - page 10, line 4 see claims 1,2,6,14,15 see page 19, line 16 ---	1-10
P,X	EP 0 781 781 A (TANABE SEIYAKU CO) 2 July 1997 see the whole document --- -/--	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 1998

Date of mailing of the international search report

26/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05089

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 0 757 049 A (TANABE SEIYAKU CO) 5 February 1997 see the whole document ----	1-10
Y	EP 0 640 622 A (DRUG DELIVERY SYSTEM INST LTD) 1 March 1995 see page 1 -----	1-10
Y	EP 0 418 099 A (RES TRIANGLE INST) 20 March 1991 see page 1 -----	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05089

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4236237 A	28-04-94	AU 669218 B	30-05-96
		AU 5022593 A	12-05-94
		CA 2109259 A	28-04-94
		EP 0595133 A	04-05-94
		JP 6293665 A	21-10-94
		NO 933854 A	28-04-94
		NZ 250030 A	22-12-94
		ZA 9307951 A	05-07-95
EP 0624377 A	17-11-94	AU 6302694 A	17-11-94
		CA 2123363 A	15-11-94
		CN 1100426 A	22-03-95
		CZ 9401187 A	16-11-94
		FI 942237 A	15-11-94
		HU 66485 A	28-11-94
		JP 7070175 A	14-03-95
		MX 9403570 A	31-01-95
		NO 941819 A	15-11-94
		NZ 260512 A	25-09-96
EP 0781781 A	02-07-97	CA 2192725 A	29-06-97
EP 0757049 A	05-02-97	AU 6069896 A	06-02-97
		BG 100758 A	28-02-97
		CA 2182244 A	03-02-97
		CN 1145365 A	19-03-97
		HU 9602122 A	28-11-97
		NO 963214 A	03-02-97
EP 0640622 A	01-03-95	US 5688931 A	18-11-97
		CA 2134348 A	27-08-94
		WO 9419376 A	01-09-94
		JP 2610792 B	14-05-97
EP 0418099 A	20-03-91	US 5049668 A	17-09-91
		US 5180722 A	19-01-93
		CA 2066780 A	16-03-91
		JP 5502017 T	15-04-93
		US 5340817 A	23-08-94
		AU 640950 B	09-09-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05089

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K5/068 A61K38/05 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 42 36 237 A (BEHRINGWERKE AG) 28. April 1994 siehe Seite 2 - Seite 3 siehe Seite 3, Zeile 17 - Zeile 44 ---	1-10
X	EP 0 624 377 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 17. November 1994 siehe Seite 1 - Seite 3 siehe Seite 9, Zeile 50 - Seite 10, Zeile 4 siehe Ansprüche 1, 2, 6, 14, 15 siehe Seite 19, Zeile 16 ---	1-10
P, X	EP 0 781 781 A (TANABE SEIYAKU CO) 2. Juli 1997 siehe das ganze Dokument ---	1-10

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Februar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/02/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05089

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 0 757 049 A (TANABE SEIYAKU CO) 5.Februar 1997 siehe das ganze Dokument ----	1-10
Y	EP 0 640 622 A (DRUG DELIVERY SYSTEM INST LTD) 1.März 1995 siehe Seite 1 -----	1-10
Y	EP 0 418 099 A (RES TRIANGLE INST) 20.März 1991 siehe Seite 1 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05089

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4236237 A	28-04-94	AU 669218 B	30-05-96
		AU 5022593 A	12-05-94
		CA 2109259 A	28-04-94
		EP 0595133 A	04-05-94
		JP 6293665 A	21-10-94
		NO 933854 A	28-04-94
		NZ 250030 A	22-12-94
		ZA 9307951 A	05-07-95
EP 0624377 A	17-11-94	AU 6302694 A	17-11-94
		CA 2123363 A	15-11-94
		CN 1100426 A	22-03-95
		CZ 9401187 A	16-11-94
		FI 942237 A	15-11-94
		HU 66485 A	28-11-94
		JP 7070175 A	14-03-95
		MX 9403570 A	31-01-95
		NO 941819 A	15-11-94
		NZ 260512 A	25-09-96
EP 0781781 A	02-07-97	CA 2192725 A	29-06-97
EP 0757049 A	05-02-97	AU 6069896 A	06-02-97
		BG 100758 A	28-02-97
		CA 2182244 A	03-02-97
		CN 1145365 A	19-03-97
		HU 9602122 A	28-11-97
		NO 963214 A	03-02-97
EP 0640622 A	01-03-95	US 5688931 A	18-11-97
		CA 2134348 A	27-08-94
		WO 9419376 A	01-09-94
		JP 2610792 B	14-05-97
EP 0418099 A	20-03-91	US 5049668 A	17-09-91
		US 5180722 A	19-01-93
		CA 2066780 A	16-03-91
		JP 5502017 T	15-04-93
		US 5340817 A	23-08-94
		AU 640950 B	09-09-93